

姜华,文海若,刘丽,等. BALB/c 小鼠、SD 大鼠及食蟹猴淋巴细胞亚群参考值的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 91-97.

Jiang H, Wen HR, Liu L, et al. Establishment of reference ranges for lymphocyte subsets in BALB/c mice, SD rats and cynomolgus monkeys [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 91-97.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11. 014

BALB/c 小鼠、SD 大鼠及食蟹猴淋巴细胞亚群参考值的建立

姜 华[#],文海若[#],刘 丽^{*},王亚楠,李路路,刘晓萌,李 伟,王 欣,
周晓冰,王三龙,霍 艳^{*}

(中国食品药品检定研究院 国家药物安全评价监测中心,药物非临床安全评价研究北京市重点实验室,
北京 100176)

【摘要】 目的 收集国家药物安全评价监测中心于 2007 年至 2019 年间符合药物非临床研究质量管理规范 (Good Laboratory Practice, GLP) 条件下完成的外周血淋巴细胞亚群测定结果,建立 BALB/c 小鼠、SD 大鼠和食蟹猴相应正常值参考范围。**方法** 使用肝素钠抗凝管采集动物外周血,303 只 BALB/c 小鼠、359 只 SD 大鼠和 460 只食蟹猴的血样经不同荧光抗体组合染色后,用流式细胞计数法对样本中表达 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 及 CD20⁺ (仅食蟹猴) 的淋巴细胞分类计数。所有数据以性别、周龄 (大鼠和小鼠) 分类后,分别计算正常参考值范围及 95% 置信区间。**结果** BALB/c 小鼠的 CD4⁺/CD8⁺ 淋巴细胞比值范围为 1.07~8.59;SD 大鼠的 CD4⁺/CD8⁺ 淋巴细胞比值范围为 0.54~11.67;年龄为 3~4 周岁的食蟹猴的 CD4⁺/CD8⁺ 淋巴细胞比值和 CD3⁺CD20⁺ 淋巴细胞百分比的范围分别是 0.35~4.22 和 1.40%~51.99%。**结论** 淋巴细胞亚群分类计数是生物制品免疫毒性评价的重要参考指标,相关背景数据的收集和确立有助于对药物作出合理的毒性评价。

【关键词】 淋巴细胞亚群;流式细胞法;食蟹猴;SD 大鼠;BALB/c 小鼠;外周血;参考值

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0091-07

Establishment of reference ranges for lymphocyte subsets in BALB/c mice, SD rats and cynomolgus monkeys

JIANG Hua[#], WEN Hairuo[#], LIU Li^{*}, WANG Yanan, LI Lulu, LIU Xiaomeng, LI Wei, WANG Xin,
ZHOU Xiaobing, WANG Sanlong, HUO Yan^{*}

(National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control;
Key Laboratory of Beijing for Nonclinical Safety Evaluation Research of Drugs, Beijing 100176, China)

【Abstract】 Objective To collect the results of peripheral blood lymphocyte subsets determination conducted in

[基金项目] 重大新药创制科技重大专项“生物大分子药物特殊评价关键技术研究”(2015ZX09501007-004);国家重点研发计划课题“干细胞移植后体内分布/动态变化及致瘤性/促瘤性等安全性评价”(2016YFA0101503);重大新药创制科技重大专项“创新药物非临床安全性评价关键技术研究”(2018ZX09201-017)。

[作者简介] 姜华 (1976—),女,实验员,学士,研究方向:药物安全性评价。E-mail: 1828800241@qq.com

文海若 (1981—),女,副研究员,博士,研究方向:药理毒理研究。E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn [#]共同第一作者

[通信作者] 霍艳 (1971—),女,研究员,博士,研究方向:药理毒理研究。E-mail: yanhuo@nifdc.org.cn

刘丽 (1976—),女,主任药师,博士,研究方向:新药非临床安全性研究。E-mail: liuli@nifdc.org.cn ^{*} 共同通信作者

National Center for Safety Evaluation of Drugs from 2007 to 2019 in accordance with Good Laboratory Practice (GLP), and establish reference ranges for corresponding normal values in BALB/c mice, Sprague Dawley (SD) rats, and cynomolgus monkeys. **Methods** Peripheral blood samples were collected from animals and put into heparin sodium anticoagulant tubes. Blood samples from 303 BALB/c mice, 359 SD rats, and 460 cynomolgus monkeys were stained with different combinations of fluorescent antibodies, and lymphocytes were classified and counted by their expression of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, and CD20⁺ (cynomolgus monkeys only) using flow cytometry. For each species, the data were classified by gender and age (rat and mouse) and then calculated for normal reference range and 95% confidence interval, respectively. **Results** The range of CD4⁺/CD8⁺ lymphocytes ratio was 1.07–8.59 in BALB/c mice and 0.54–11.67 in SD rats. Ranges of CD4⁺/CD8⁺ lymphocytes ratio and the percentage of CD3⁺CD20⁺ lymphocytes in cynomolgus monkeys aged 3–4 years were 0.35–4.22 and 1.40%–51.99%, respectively. **Conclusions** Classified counts of lymphocyte subsets provide an important reference index for evaluating the immunotoxicity of biological products. The collection and establishment of relevant background data will facilitate more reasonable evaluations of drug toxicity.

【Keywords】 lymphocyte subsets; flow cytometry; cynomolgus monkey; SD rat; BALB/c mouse; peripheral blood; reference value

生物制品在创新药物研发中占据重要地位,在全球最畅销的药物排行榜中占据半壁江山。生物制品的主要药理作用是通过刺激机体免疫系统产生免疫物质来激活人体免疫系统^[1-2]。免疫系统功能异常可导致感染及肿瘤性病变,严重时可危及生命。药物免疫毒性是当前仅次于肝毒性的全球第二大新药召回原因,故生物制品的免疫毒性风险是其安全性评价的重要关注点^[3]。淋巴细胞表面的跨膜糖蛋白以表面受体的形式,可特异性识别并参与机体抗原呈递过程,并参与免疫调节功能。如 T 淋巴细胞中 CD4⁺ 和 CD8⁺ 表型的数值变化常用于监测肿瘤、和获得性免疫缺陷综合征 (acquired immune deficiency syndrome, AIDS) 等与免疫功能有关的疾病的发生与发展^[4-6]。使用流式细胞术分类计数淋巴细胞亚群已成为非临床安全性评价中常规的免疫毒性评价手段之一。常见的淋巴细胞亚群分类包括 CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺ 与 CD3⁺CD20⁺ 细胞等^[7]。

小鼠、大鼠和食蟹猴均为常用的安全性评价动物模型。使用标准化的样本制备方法,在符合药物非临床研究质量管理规范 (Good Laboratory Practice, GLP) 试验条件下建立淋巴细胞亚群分类背景数据,有助于研究和监管者了解数值变化范围,对动物免疫毒性作合理评估^[8]。当前国内食蟹猴外周血淋巴细胞亚群流式检测参考值相关文献已有数篇报道^[8-11],但数据涉及动物数量有限 (不超过 100 只) 或仅分析单一性别,仅有一篇为由安评机构汇总的基于多年大量动物的背景数据^[8]。此外,大鼠及小鼠淋巴细胞亚群流式检测参考值相关报道较少,因不同品系的大鼠和小鼠其背景值范

围也有所差异,有必要在安评机构中建立基于大量动物样本数的淋巴细胞亚群的背景值范围。本研究收集国家药物安全评价监测中心 2007 年至 2019 年在 GLP 条件下开展的生物制品安全性评价研究中未给药组或溶媒组的 BALB/c 小鼠、SD 大鼠和食蟹猴 (广西或北京) 的 CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺ 和 CD3⁺CD20⁺ (仅食蟹猴) 检测值,根据动物性别不同分别汇总以确定不同种属动物淋巴细胞亚群的参考值,为生物技术类药物的免疫毒性评价提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF/VAF 级 BALB/c 小鼠共 303 只 (来自 10 项研究), SPF/VAF 级 SD 大鼠共 359 只 (来自 11 项研究), 雌雄各半 (购入时约 5~9 周龄), 小鼠体重范围约 25~40 g, 大鼠体重约 300~400 g, 均购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK (京) 2002-0003] [SCXK (京) 2012-0001] [SCXK (京) 2016-0011]。动物饲养于本中心 [SYXK (京) 2011-0037] [SYXK (京) 2016-0045] 屏障系统的大鼠笼具 (长×宽×高: 460 mm×315 mm×210 mm) 和小鼠笼具 (长×宽×高: 350 mm×140 mm×136 mm) 内, 饲养密度为 2~3 只/笼。给予鼠全价颗粒饲料喂养, 自由摄食及饮水。大鼠和小鼠饲养于恒温 (20℃~26℃)、恒湿 (40%~70%) 的条件下, 明暗周期为 12 h, 每小时最低换气次数 15 次。

普通级食蟹猴共 460 只, 雌雄各半 (购入时约 3~4 岁, 体重约 3~5 kg, 来自共 12 项研究), 购自广西桂东灵长类开发实验有限公司 [SCXK (桂) 2011

-0001][SCXK(桂)2016-0001]或北京协尔鑫生物资源研究有限责任公司[SCXK(京)2015-0011]。饲养于本中心[SYXK(京)2011-0037][SYXK(京)2016-0045]普通级动物房不锈钢笼具内(长×宽×高:80 cm×70 cm×75 cm),单笼饲养。动物自由饮水,每只动物每天定量给料和水果各 150 g,自由摄取。食蟹猴饲养于恒温(16℃~26℃)、恒湿(40%~70%)的条件下,明暗周期为 12 h,每次小时最低换气次数 8 次。

所有研究方案均通过国家药物安全评价监测中心实验动物福利伦理委员会(institutional animal care and use committee, IACUC)的伦理审查(IACUC 编号为:IACUC-2008-023、IACUC-2010-008、IACUC-2013-031、IACUC-2014-068、IACUC-2015-028、IACUC-2016-005、IACUC-2017-005、IACUC-2018-001、IACUC-2018-058,等等),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

主要试剂包括流式仪校准微球(BD Calibrite™ 3-color,批号:7347634、APC bead,批号:80129)、BALB/c 小鼠用抗体 FITC-CD8a(Clonel 53-6.7,批号:3177592,8152865)、PerCP-CD4(Clonel RM4-5,批号:8025572,8194889,8025572)、Hamster 抗 Mouse PE-CD3e(Clonel 145-2C11,批号:6012949,7158744)和食蟹猴用抗体 FITC-CD8(Clonel RPA-T8,批号:5341673,5159821)、PE-CD4(Clonel L200,批号:7299836,5313876,5057543)、PerCP-CD3(Clonel SP34-2,批号:8124735,6092584,7069961)和 APC-CD20(Clonel 2H7,批号:3291627)均购自 BD 公司;SD 大鼠用抗体 CD3-FITC/CD4-RPE(Clonel IF4:W3/25,批号:1113)、CD8ALPHA:Alexa Fluor647(Clonel OX-8,批号:0310)购自 BIO-RAD;红细胞裂解液主要成分:氯化氨(批号:20161208)、碳酸氢钾(批号:20150924)和乙二胺四乙酸二钠(批号:20140328)购自国药集团,磷酸盐缓冲液(PBS 批号:AD2016267,AD22391274)购自 Hyclone;多聚甲醛(批号:20170825)购自国药集团,使用前经 PBS 稀释为 1%的应用液。主要仪器包括 BD FACSCalibur 流式细胞仪,分析软件 Cell Quest™ Pro;H-500FRS 高速离心机。

1.3 检测方法

1.3.1 血样采集

本研究收录动物数据均来自未给药动物或生

物制品溶媒对照组动物数据,全部动物采血前过夜禁食。啮齿类动物腹腔注射戊巴比妥钠(45 mg/kg)麻醉后经腹主静脉采血,食蟹猴不麻醉由前臂静脉采血。全部动物采集全血 0.3~0.5 mL,血样于肝素钠抗凝管中混匀,所有样本在采集后 4 h 之内完成制备与测定分析。

1.3.2 检测流程

将各相应荧光抗体组合和 50 μL 抗凝全血加入流式管中,混匀样本后于室温、避光条件下孵育 30 分钟。在流式管中分别加入 1 mL 的红细胞裂解液并混匀,小鼠和大鼠样本的裂解时间通常为 1~3 min,食蟹猴样本约 4~9 min。红细胞充分裂解后,以 1000 r/min 离心 5 min,弃上清并加入 1 mL PBS 再次离心(离心条件同上)并弃上清。每管加入 1%多聚甲醛重悬细胞后上机测定。小鼠和大鼠样本共收集 3000~5000 个淋巴细胞,食蟹猴共收集 5000 个淋巴细胞。分别计算表达 CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺和 CD3⁻CD20⁺(仅食蟹猴)的淋巴细胞百分率。

1.4 统计学方法

所有数据以种属及性别不同分组,列出其最大值和最小值。使用 Kolmogorov-Smirnov (IBM SPSS Statistics)检验数据的正态性,当数据呈正态分布时(双尾检验, $P \geq 0.05$ 时)列出其平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)及 95%置信区间;当数据分布不呈正态时(双尾检验, $P < 0.05$ 时),分别描述四分位数(即 25%、50%和 75%)。

2 结果

雄性和雌性 BALB/c 小鼠外周血 CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺和 CD4⁺/CD8⁺淋巴细胞范围(表 1),雄性的结果分别为 45.45%~85.86%、12.73%~42.48%、1.07~6.74;雌性为 53.27%~84.15%、8.95%~37.49%、1.42±8.59。雄性和雌性 SD 大鼠平均 CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺和 CD4⁺/CD8⁺范围(表 2),雄性的结果分别为 48.26%~84.53%、16.35%~62.75%、0.99~8.78;雌性为 34.06%~86.24%、7.39%~62.75%、0.54±11.67。约 3~4 岁龄雄性和雌性食蟹猴 CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺和 CD3⁻CD20⁺范围(表 3),雄性的结果分别为 28.42%~72.83%、23.93%~65.32%、0.44±3.04、1.40%~47.91%;雌性为 22.70%~75.90%、17.43%~65.13%、0.35±4.22、9.6%~51.99%。

表 1 BALB/c 小鼠 T 淋巴细胞亚群参考范围
Table 1 Reference range of T lymphocyte subsets in BALB/c mice

性别 Sex	指标 Indices	CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
雄性 Male	最大值 Maximum value	85. 86	42. 48	6. 74
	最小值 Minimum value	45. 45	12. 73	1. 07
	动物数 Number of animals		152	
	Kolmogorov-Smirnov 检验 P 值(双尾)			
	Kolmogorov-Smirnov P value (two tailed test)	0. 005	0. 003	0. 029
	$\bar{x}\pm s$	/	/	/
	95%置信区间上限 95% CL upper	/	/	/
	95%置信区间下限 95% CL lower	/	/	/
	25%	70. 23	18. 14	2. 78
	50%	75. 57	20. 72	3. 55
	75%	79. 38	25. 21	4. 37
	最大值 Maximum value	84. 15	37. 49	8. 59
	最小值 Minimum value	53. 27	8. 95	1. 42
	动物数 Number of animals		151	
雌性 Female	Kolmogorov-Smirnov 检验 P 值(双尾)			
	Kolmogorov-Smirnov P value (two tailed test)	0. 034	0. 200	0. 003
	$\bar{x}\pm s$	/	22. 71±4. 71	/
	95%置信区间上限 95% CL upper	/	23. 47	/
	95%置信区间下限 95% CL lower	/	21. 96	/
	25%	69. 38	/	2. 64
	50%	72. 67	/	3. 18
	75%	77. 48	/	3. 88

表 2 SD 大鼠 T 淋巴细胞亚群参考范围
Table 2 Reference range of T lymphocyte subsets in SD rats

性别 Sex	指标 Indices	CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
雄性 Male	最大值 Maximum value	84. 53	62. 75	8. 78
	最小值 Minimum value	48. 26	16. 35	0. 99
	动物数 Number of animals		180	
	Kolmogorov-Smirnov 检验 P 值(双尾)			
	Kolmogorov-Smirnov P value (two tailed test)	0. 200	0. 200	0. 000
	$\bar{x}\pm s$	66. 46±6. 31	33. 00±7. 46	/
	95%置信区间上限 95% CL upper	67. 37	34. 59	/
	95%置信区间下限 95% CL lower	65. 56	31. 41	/
	25%	/	/	1. 83
	50%	/	/	2. 18
	75%	/	/	2. 69
	最大值 Maximum value	86. 24	62. 75	11. 67
	最小值 Minimum value	34. 06	7. 39	0. 54
	动物数 Number of animals		179	
雌性 Female	Kolmogorov-Smirnov 检验 P 值(双尾)			
	Kolmogorov-Smirnov P value (two tailed test)	0. 200	0. 200	0. 000
	$\bar{x}\pm s$	63. 91±7. 59	31. 28±8. 43	/
	95%置信区间上限 95% CL upper	64. 99	32. 49	/
	95%置信区间下限 95% CL lower	62. 82	30. 07	/
	25%	/	/	1. 67
	50%	/	/	2. 06
	75%	/	/	2. 6

表 3 食蟹猴淋巴细胞亚群参考范围
Table 3 Reference range of lymphocyte subsets in cynomolgus monkeys

性别 Sex	指标 Indices	T 细胞亚群 T cell subsets CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	T 细胞亚群 T cell subsets CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	B 细胞亚群 B cell subsets CD4 ⁺ /CD8 ⁺	B 细胞亚群 B cell subsets CD3 ⁻ CD20 ⁺ (%)
雄性 Male	最大值 Maximum value	72.83	65.32	3.04	47.91
	最小值 Minimum value	28.42	23.93	0.44	1.40
	动物数 Number of animals		230		81
	Kolmogorov-Smirnov 检验 P 值(双尾) Kolmogorov-Smirnov P value (two tailed test)	0.094	0.200	0.000	0.000
	$\bar{x}\pm s$	49.21±7.99	43.73±7.83	/	/
	95%置信区间上限 95% CL upper	50.25	44.74	/	/
	95%置信区间下限 95% CL lower	48.18	42.72	/	/
	25%	/	/	0.94	14.92
	50%	/	/	1.12	18.17
	75%	/	/	1.38	22.83
雌性 Female	最大值 Maximum value	75.90	65.13	4.22	51.99
	最小值 Minimum value	22.70	17.43	0.35	9.60
	动物数 Number of animals		230		81
	Kolmogorov-Smirnov 检验 P 值(双尾) Kolmogorov-Smirnov P value (two tailed test)	0.009	0.007	0.000	0.008
	$\bar{x}\pm s$	/	/	/	/
	95%置信区间上限 95% CL upper	/	/	/	/
	95%置信区间下限 95% CL lower	/	/	/	/
	25%	48.83	35.24	1.09	12.94
	50%	53.74	39.89	1.34	17.01
	75%	58.25	44.57	1.64	22.67

上述背景数值分布范围较广,故对不同种属及性别动物的淋巴细胞亚群分布情况作进一步分析汇总。BALB/c 小鼠的 $CD3^+CD4^+$ 数值分布集中于 60%~80%, $CD3^+CD8^+$ 分布多集中于 15%~35%, $CD4^+/CD8^+$ 比值集中于 1.5~4.5 的区间范围(表 4);SD 大鼠的 $CD3^+CD4^+$ 数值分布集中于 60%~

80%, CD3⁺CD8⁺ 分布集中于 25% ~ 45%, CD4⁺/CD8⁺ 比值多集中于 1.5~4.5 的区间范围(表 5); 食蟹猴的 CD3⁺CD4⁺ 分布集中于 40% ~ 60%, CD3⁺CD8⁺ 分布多集中于 30% ~ 50%, CD4⁺/CD8⁺ 比值多集中于 1.0~2.0, CD3⁻CD20⁺ 分布多集中于 10% ~ 30%(表 6)。上述分布情况未见性别差异。

表 4 BALB/c 小鼠淋巴细胞亚群总体分布情况
Table 4 Overall distribution of lymphocyte subsets in BALB/c mice

性别 Sex	CD3 ⁺ CD4 ⁺ 区间(%) CD3 ⁺ CD4 ⁺ interval	例数 Cases	比例(%) Ratio	CD3 ⁺ CD8 ⁺ 区间(%) CD3 ⁺ CD8 ⁺ interval	例数 Cases	比例(%) Ratio	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ 区间 CD4 ⁺ /CD8 ⁺ interval	例数 Cases	比例(%) Ratio
雄性 Male	40~60	7	4.6	<15	7	4.6	<1.5	1	0.7
	60~70	40	26.3	15~25	99	65.1	1.5~3.0	61	40.1
	70~80	88	57.9	25~35	43	28.3	3.0~4.5	73	48
	80~90	16	10.5	>35	2	1.3	4.5~6.0	11	7.2
	/	/	/	/	/	/	>6.0	5	3.3
	合计 Total	151			151			151	
雌性 Female	40~60	7	4.6	<15	17	11.2	<1.5	3	2
	60~70	28	18.4	15~25	95	62.5	1.5~3.0	44	28.9
	70~80	82	53.9	25~35	36	23.7	3.0~4.5	71	46.7
	80~90	35	23	>35	4	2.6	4.5~6.0	29	19.1
	/	/	/	/	/	/	>6.0	5	3.3
	合计 Total	152			152			152	

表 5 SD 大鼠 T 淋巴细胞亚群总体分布情况
Table 5 Overall distribution of lymphocyte subsets in SD rats

性别 Sex	CD3 ⁺ CD4 ⁺ 区间 (%) CD3 ⁺ CD4 ⁺ interval	例数 Cases	比例 (%) Ratio	CD3 ⁺ CD8 ⁺ 区间 (%) CD3 ⁺ CD8 ⁺ interval	例数 Cases	比例 (%) Ratio	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ 区间 CD4 ⁺ /CD8 ⁺ interval	例数 Cases	比例 (%) Ratio
雄性 Male	<50	1	0.6	<15	2	1.1	<1.5	15	8.3
	50~60	27	15	15~25	28	15.6	1.5~3.0	141	78.3
	60~70	104	57.8	25~35	107	59.4	3.0~4.5	18	10
	70~80	45	25	35~45	42	23.3	4.5~6.0	5	2.8
	>80	3	1.7	>45	1	0.6	>6.0	1	0.6
	合计 Total	180			180			180	
雌性 Female	<50	9	5	<15	1	0.6	<1.5	33	18.4
	50~60	42	23.5	15~25	28	15.6	1.5~3.0	127	70.9
	60~70	96	53.6	25~35	86	48	3.0~4.5	10	5.6
	70~80	28	15.6	35~45	55	30.7	4.5~6.0	8	4.5
	>80	4	2.2	>45	9	5	>6.0	1	0.6
	合计 Total	179			179			179	

表 6 食蟹猴淋巴细胞亚群总体分布情况
Table 6 Overall distribution of lymphocyte subsets in cynomolgus monkeys

性别 Sex	CD3 ⁺ CD4 ⁺			CD3 ⁺ CD8 ⁺			CD4 ⁺ /CD8 ⁺			CD3 ⁻ CD20 ⁺		
	区间 (%) CD3 ⁺ CD4 ⁺ interval	例数 Cases	比例 (%) Ratio	区间 (%) CD3 ⁺ CD8 ⁺ interval	例数 Cases	比例 (%) Ratio	区间 CD4 ⁺ /CD8 ⁺ interval	例数 Cases	比例 (%) Ratio	区间 (%) CD3 ⁻ CD20 ⁺ interval	例数 Cases	比例 (%) Ratio
雄性 Male	<30	3	1.3	<20	1	0.4	<0.5	3	1.3	<10	1	1.2
	30~40	14	6.1	20~30	20	8.7	0.5~1.0	41	17.8	10~20	52	64.2
	40~50	53	23	30~40	97	42.2	1.0~2.0	158	68.7	20~30	20	24.7
	50~60	120	52.2	40~50	94	40.9	2.0~3.0	25	10.9	30~40	7	8.6
	60~70	37	16.1	50~60	11	4.8	>3.0	3	1.3	>40	1	1.2
	>70	3	1.3	>60	7	3	/	/	/	/	/	/
雌性 Female	合计 Total	230			230			230			81	
	<30	1	0.4	<20	0	0	<0.5	4	1.7	<10	3	3.7
	30~40	24	10.4	20~30	6	2.6	0.5~1.0	82	35.7	10~20	47	58
	40~50	99	43	30~40	64	27.8	1.0~2.0	133	57.8	20~30	25	30.9
	50~60	83	36.1	40~50	119	51.7	2.0~3.0	10	4.3	30~40	5	6.2
	60~70	22	9.6	50~60	32	13.9	>3.0	1	0.4	>40	1	1.2
	>70	1	0.4	>60	9	3.9	/	/	/	/	/	/
	合计 Total	230			230			230			81	

3 讨论

免疫毒性评价已成为药物毒理学评价中不可或缺或单元。使用流式细胞计数法 (flowcytometry, FM) 检测外周血淋巴细胞表型已成为毒理学评价实验室常规的试验手段,该方法与免疫组化检测法相比灵敏度高、更客观、且可以更好地兼容高通量评价。外周血淋巴细胞表型是评估动物免疫功能的重要指标,而动物的产地、环境、样本制备和所用试剂不同等诸多因素均可对其数值产生影响^[12-13]。在实验室内确立一套正常动物外周血淋巴细胞亚群正常参考范围,有利于查找研究数据存在的问题并对药物潜在免疫毒性作出有效判断,满足不断提高的实验结果准确度的要求,从而推动生物制品产品研发并更好地服务于毒理数据监管。当试验中阴性组数值偏离背景数据时,认为该组数据不可

靠,应查找原因并重复采血检测。本研究汇总 12 年来我中心未给药或仅给予溶媒的啮齿类动物和灵长类动物的淋巴细胞亚群分类结果,所有数据均来自 10 以上次独立研究,背景值范围在文献报道范围之内^[8-11]。
CD3⁺CD4⁺为辅助/诱导细胞亚群,主要通过分泌的淋巴因子来增强和扩大免疫应答;而 CD3⁺CD8⁺属于抑制/细胞毒细胞亚群,可特异性杀伤靶细胞,具有抗病毒、抗肿瘤及重要的调节作用^[14]。影响 CD4⁺/CD8⁺的因素除种属外,也与年龄和性别等因素有关。如,衰老与免疫功能减退息息相关。本研究中发现 BALB/c 小鼠、SD 大鼠和食蟹猴的 CD4⁺/CD8⁺范围分别为 1.07~8.59、0.54~11.67 和 0.35~4.22,范围区间大,与个别动物个体差异导致头尾两端的数据差异大有关。故进一步对所有数据分区间进行汇总,发现相同种属大多数动物的数

值(约 70%~85%左右)位于相同区间内,且数据分布无明显性别差异。黄秋香等对不同性别和不同周龄的食蟹猴的淋巴细胞亚群分类结果比较分析,发现 3~5 岁的食蟹猴存在雌性动物 CD3⁺CD4⁺较高的现象,而 1.5~2 岁的食蟹猴数据中未见上述差异^[8]。此外,李岩等汇总的 4~7 岁食蟹猴淋巴细胞亚群分类结果中亦未见性别差异^[11]。食蟹猴通常约 4 岁左右达性成熟,本中心用于药物临床前安全性评价的食蟹猴年龄通常为 3~4 岁,处于接近性成熟或性成熟伊始阶段。辅助性 T 淋巴细胞(CD3⁺CD4⁺)变化可与动物的性成熟和胸腺萎缩程度有关,动物的年龄以及雌性动物性成熟时间早于雄性动物等因素可能是造成年龄和性别差异的主要原因。因上述文献使用动物产地各异,不排除存在食蟹猴产地原因。

除 CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺和 CD3⁻CD20⁺外,其它淋巴细胞表型对特殊靶向的生物制品的免疫毒性也有一定提示,然而涉及研究较少,未获得大量数据用于制定背景数据。如自然杀伤细胞(natural killer cell,NK)认为是 T 细胞和 B 细胞外的第三大最重要的免疫细胞,可通过 CD16⁺或 CD56⁺识别。作为天然免疫的核心细胞,外周血中 NK 的多寡也可反应受试物的免疫毒性^[15]。而表达 CD40⁺的 B 细胞可激活树突状细胞(dendritic cell,DC)并在 CD8⁺的调控中至关重要^[16]。当前已有针对 CD40⁺开发的一系列抗体抗肿瘤药物,如 SEA-CD40、鲁卡木单抗、阿韦舒托等陆续进入临床,上述药物的毒性评估中应关注 CD40⁺的表达水平。此外,近年来靶向 CD19、CD20 和 CD22 的嵌合抗原受体(Chimeric antigen receptor, CAR)修饰的 T 细胞治疗在复发/难治型急性淋巴细胞白血病的治疗中彰显优势^[17,18],类似细胞治疗产品陆续进入安评领域,而表型为 CD19⁺、CD20⁺和 CD22⁺的淋巴细胞表达水平也成为其毒性监测的关注点。今后应注意收集相关数值,完善背景数据积累。

本研究规范而系统性地收集了 12 年来大量小鼠、大鼠和食蟹猴的外周血淋巴细胞亚群背景数据,尤其是首次报道了基于大量样本的小鼠和大鼠淋巴细胞亚群背景数据,作为生物制品临床前动物试验数据解读的重要支持,对进一步讨论药物或疾病对动物免疫功能状态的影响提供参考。当前有关啮齿类动物的淋巴细胞亚群背景值信息罕有报道,本文对以啮齿类动物为模型的生物制品评价及研究具有借鉴意义。

参考文献:

[1] Davda J, Declerck P, Hu-Lieskovan S, et al. Immunogenicity of

immunomodulatory, antibody-based, oncology therapeutics[J]. J Immunother Cancer, 2019,7(1):105.

[2] Zhang J, Medeiros LJ, Young KH. Cancer immunotherapy in diffuse large B-cell lymphoma[J]. Front Oncol, 2018, 8: 351.

[3] 王雅坤, 张小田. 免疫检查点抑制剂的毒性风险分析[J]. 临床肿瘤学杂志, 2017,22(8):735-741.

[4] Song K, Wu ZM, Peng LY, et al. Canine distemper virus increased the differentiation of CD4⁺CD8⁺ T cells and mRNA expression of inflammatory cytokines in peripheral blood lymphocyte from canine[J]. Microb Pathog, 2019, 131: 254-258.

[5] Lisco A, Wong CS, Lage SL, et al. Identification of rare HIV-1-infected patients with extreme CD4⁺ T cell decline despite ART-mediated viral suppression [J]. JCI Insight, 2019, 4(8): 127113.

[6] Zhang X, Su L, Huang H, et al. Coating with Chitooligosaccharides enhances the Cytokine induction of *Listeria ivanovii*-based vaccine strain[J]. J Pharm Sci, 2019, 108(9): 2926-2933.

[7] 王志鹏, 李晨, 曹云新, 等. 实验用猕猴 CD3、CD4、CD8、CD20 细胞阳性率的测定[J]. 中国比较医学杂志, 2005, 15(5):287.

[8] 黄秋香, 孙建华, 秦秋平, 等. 食蟹猴外周血淋巴细胞亚群的流式法分析验证和正常参考值测定[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(z2):75-78.

[9] 韦毅, 符明泰, 阳明, 等. 正常成年雄性食蟹猴部分免疫功能指标观测[J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(3):236-238.

[10] 佟巍, 王卫, 魏强. 北京地区实验恒河猴外周血 T 淋巴细胞亚群分析[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(5):38-40.

[11] 李岩, 何君, 孙井江, 等. 实验用食蟹猴生物学指标的研究[J]. 现代预防医学, 2010, 37(13):2503-2505.

[12] 张琰, 温浩, 张朝霞, 等. 新疆地区维吾尔族和汉族血液淋巴细胞免疫表型参考值范围的调查[J]. 中国实验血液学杂志, 2006, 14(1):133-136.

[13] 季芳, 饶军华, 刘晓明. 人工饲养恒河猴血液生化正常参考值的测定与分析[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(6):345-349.

[14] Hendrickx AG, Makori N, Peterson P. The nonhuman primate as a model of developmental immunotoxicity[J]. Hum Exp Toxicol, 2002, 21(9-10):537-542.

[15] Davis ZB, Vallera DA, Miller JS, et al. Natural killer cells unleashed: Checkpoint receptor blockade and BiKE/TriKE utilization in NK-mediated anti-tumor immunotherapy[J]. Semin Immunol, 2017, 31:64-75.

[16] Vonderheide RH. Prospect of targeting the CD40 pathway for cancer therapy[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(4):1083-1088.

[17] Fry TJ, Shah NN, Orentas RJ, et al. CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy [J]. Nat Med, 2018, 24(1):20-28.

[18] Chappell CP, Draves KE, Clark EA. CD22 is required for formation of memory B cell precursors within germinal centers [J]. PLoS One, 2017, 12(3):e174661.